

Mia Nurmi

# DFS-70 määrittelyn käyttö tumavasta- aineanalytiikassa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko AMK

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

14.6.2013

Tekijä Otsikko  Sivumäärä Aika	Mia Nurmi DFS-70 määrittelyn käyttö tumavasta-aine analytiikassa  26 sivua + 5 liitettä 14.6.2013
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaajat	Biokemisti Marika Havana Lehtori Anja Matzke
<p>Tumavasta-ainetutkimuksella (S-ANA Hep-2) on jo pitkään tutkittu autoimmuunisairauksia. Se on edullinen, mutta epäspesifi tutkimus, jonka tuloksen tarkentamiseen käytetään monissa laboratorioissa jatkotutkimuksia. Tulosten tulkinta tapahtuu mikroskoopin avulla ja tulkinta voi täten vaihdella tulkitsijan mukaan. Tutkimuksissa on selvinnyt että hienojakoisen täplikkeen (DFS, dence fine speckled) kuvion esiintyminen ei viittaa potilaalle kehittyvän autoimmuunisairautta. Hienojakoista täplikästä kuviota on erityisen vaikeaa erottaa homogeenisestä tumavasta-ainekuviosta.</p> <p>INOVA Diagnostics -yhtiö on kehittänyt immunologisen ELISA menetelmään perustuvan määrittelyn DFS-70. Määrittelyllä mitataan potilaan seeruminäytteessä mahdollisesti olevat DFS70 antigeenia vastaan olevat vasta-aineet. Tämä olisi edullinen tapa seuloa mikroskoopilla väärin positiivisiksi tulkittuja näytteitä.</p> <p>Työ tehtiin Yhtyneet Medix laboratorion tiloissa toukokuussa 2012. Tavoitteenani oli testata Inovan Quanta Lite DFS-70 ELISA testin toimivuutta sekä tutkia, löytyykö Yhtyneet Medix laboratorioden S-ANA tutkimukseen tulleesta näytemateriaalista tällaisia DFS70 positiivisia näytteitä.</p> <p>101 analysoidusta potilasnäytteestä löytyi 18 näytettä, joissa oli anti-DFS70 vasta-aineita. Näytteistä tehtiin vielä jatkotutkimuksena DNA ja ENA -vasta-ainetutkimukset. Näiden vasta-aineiden esiintyminen viittaa autoimmuunisairauteen ja tietyt vasta-aineet antavat tarkkoja viitteitä sairauden nimestä. 18 positiivisesta näytteestä 6:sta löytyi joko DNA tai ENA vasta-aineita.</p> <p>Tulokset osoittavat sen, että menetelmä toimii ja vain kokeneet analyttikot tunnistavat DFS kuvion osasta DFS70 antigeenille positiivisesta näytteestä. Tuloksissa oli kuitenkin sellaisia poikkeamia INOVA Diagnostics yhtiön omiin tutkimustuloksiin, että lisätutkimuksia tarvitaan.</p>	
Avainsanat	DFS, tumavasta-aine

Author Title	Mia Nurmi The Usage of DFS-70 Assay in Antinuclear Antibody Analytics
Number of Pages Date	26 pages + 5 appendices 14 June 2013
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme Specialisation	Biomedical Laboratory Science Biomedical Laboratory Science
Instructors	Marika Havana, Biochemist Anja Matzke, Senior Lecturer
<p>SARD (systemic autoimmune rheumatic disease) has been studied with ANA HEp-2 assay for decades. It is a cheap but unspecific method, and other methods have been used to target assays results. However the results may vary by the researcher carrying out the study. The studies have shown that the presence of DFS (dense fine speckled) pattern does not mean that the patient will get SARD later on. The purpose of this study was to find out if there was DFS70 positive serum samples in the S –ANA samples of the United Medix Laboratories Ltd, Espoo, Finland.</p> <p>This study was performed in May 2012 at the Immunology Laboratory of the United Medix Laboratories Ltd. I analysed 101 patient samples with the INOVA Diagnostics Inc. Quanta Lite reagent package.</p> <p>There were 18 DFS positive samples among the 101 test samples. These 18 samples were tested for DNA antinuclear antibodies and ENA extrable antinuclear antibodies as well. Six samples of 18 had either DNA or ENA antinuclear antibodies. This means that theses six patients develop SARD later on or they already have the disease.</p> <p>The results showed that the INOVA Diagnostic Inc. Quanta Lite reagent package works as it is meant to be. Only a very experienced analyst may determine the presence of DFS pattern in the microscope.</p>	
Keywords	DFS, antinuclear antibody

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tarkoitus	2
3	Menetelmät	3
3.1	Tumavasta-ainetutkimus S -ANA	3
3.1.1	Suorittaminen	3
3.1.2	Tulosten tulkinta	4
3.2	DFS-70	9
3.2.1	Suorittaminen	10
3.2.2	Tulosten tulkinta	10
3.3	DNA-vasta-ainetutkimus ja tuman liukoiset vasta-aineet (S -DNAAb ja S - ENAAb)	11
3.3.1	DNA vasta-ainetutkimus (S -DNAAb)	11
3.3.2	Tuman liukoiset vasta-aineet (S -ENAAb)	11
4	Työn suorittaminen	13
4.1	Näytemateriaali	13
4.2	Mittausten suorittaminen	13
4.3	Luottettavuus ja eettisyys	17
5	Tulokset	23
6	Pohdinta	26
	Lähteet	27
	Liitteet	
	Liite 1. Termistö	
	Liite 2. Näytteiden työstönumerot	
	Liite 3. Toteutuneet pipetointikaaviot kuoppalevyille	
	Liite 4. Tulosten laskenta	
	Liite 5. DFS70 –positiiviset näytteet	

## 1 Johdanto

Autoimmuunisairaudet ovat sairauksia, joissa elimistön puolustusjärjestelmä hyökkää kehon omia kudoksia vastaan. Tällöin elimistöön on muodostunut autovasta-aineita tai autoreaktiivisia soluja esimerkiksi virusinfektion seurauksena. Autoimmuunisairauksia on kahdenlaista tyyppiä. Toiset sairaudet vaikuttavat yhdessä kohde-elimessä, kun taas toiset sairaudet vahingoittavat koko elimistöä. Monesti autoimmuunisairaudet kuitenkin ovat näiden kahden tyylin välimuotoja. Sairaus voi alkaa elinspesifisenä ja edetessään muuttua koko elimistöä vahingoittavaksi. (Dorresteyn Stevens 2003: 213-215.)

Systeemisten autoimmuunisairauksien tutkimisessa on käytetty jo pitkään S -ANA-tutkimusta (serum antinuclear antibody) (Mariz ym. 2011). Menetelmässä näytteen vasta-aineet kiinnitetään substraattilasilla olevan HEp-2 solulinjan soluihin ja kiinnittyneet vasta-aineet osoitetaan FITC-konjugoiduilla antihumaani IgG:llä epäsuoralla immunofluoresenssitekniikalla. Fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltaessa solussa näkyy fluoresoiva kuvio, mikäli potilaalla on vasta-aineita tuman osia kohtaan. Tiettyjen kuvioiden on todettu viittaavan eri sairauksiin, kuten esimerkiksi homogeeninen kuvio viittaa SLE:een (systemic lupus erythematosus).

Hienojakoista täplikästä (dense fine speckled, DFS) kuviota on todettu esiintyvän vain systeemisten autoimmuunisairauksien suhteen terveillä ihmisillä (Mariz ym 2011). Eri vahvuisia kuvioita voi ilmetä myös lääkeainereaktioissa. Tällainen väärä positiivinen tulos vaikeuttaa potilaan diagnoosia ja saattaa aiheuttaa turhia hoitotoimenpiteitä ja psyykkistä stressiä potilaalle ja hoitavalle yksikölle (Fritzler 2011)

DFS-kuviosta (hienojakoisesta täplikästä) on määritetty antivasta-aine DFS70, jonka ilmeneminen kuvion yhteydessä viittaa siihen, että potilaalle ei kehity autoimmuunireumasairautta (Mariz ym. 2011). Opinnäytetyössä on tarkoitus selvittää, löytyykö Yhtyneet Medix laboratorioden näytemateriaalista tällaisia näytteitä.

DFS-70 tutkimus on INOVA Diagnostics –yhtiön uusi määrittely, jonka avulla tumavasta-aine seulonnan tuloksia voidaan tarkentaa. DFS-70 on immunologinen ELISA –määrittely, jonka loppuvaiheessa substraatin lisäyksen jälkeen väri mitataan spektrofotometrisesti ja absorbanssin avulla vastaus lasketaan laskukaavalla.

S -ANA tutkimuksen jatkotutkimuksena käytetään tavallisesti S -DNAAb ja S -ENAAb tutkimuksia. Ne ovat analysaattorilla tehtävät FEIA menetelmään perustuvat tutkimukset. Tutkimukset voidaan suorittaa myös ilman S -ANA tutkimusta. DNA- vasta-ainemääritys kertoo SLE:n etenemisestä. Matalia pitoisuuksia voidaan löytää myös muista autoimmuunisairauksista sekä terveistä henkilöistä. ENA-vasta-ainemääritys osatutkimuksineen antaa viitteitä autoimmuunisairaudesta nimestä, esimerkiksi SLE, Sjögrenin sydrooma ja MCTD (mixed connective tissue disease) voidaan tunnistaa tämän tutkimuksen avulla. DFS-70 tutkimus olisi hyvä lisä poistamaan vääriä positiivisia tuloksia, jotta kaikille S -ANA tutkimuksesta positiivisiksi saaduille näytteille ei tarvitsi tehdä useita jatkotutkimuksia. Tutkimus myös selittää tilannetta, jossa tumavasta-ainetulos on positiivinen, mutta liukoisia tumavasta-aineita tai DNA-vasta-aineita ei potilaan seerumissa ole. Kun terveiden potilaiden väärät positiiviset tulokset saadaan seulottua pois DFS-70 määrittelyllä, tehdään muut vasta-ainemääritykset vain niille potilaille, joille ne todella tarvitsee tehdä.

Työssäni esiintyy monia samankaltaisia käsitteitä, jotka tulevat ilmi tekstiä lukiessa. Olen kuitenkin kerännyt tärkeimmät käsitteet ja niiden selitykset ensimmäiseen liitteeseen. Termistö helpottaakseni lukijaa ymmärtämään kirjoitusasultaan samannäköisten termien erottamista toisistaan.

## 2 Opinnäytetyön tarkoitus

Työni aiheena on arvioida INOVA- valmistajan DFS-70 ELISA-menetelmän toimivuutta ja DFS-70 määrittelyn soveltuvuutta positiivisten tumavasta-ainelöydösten jatkotutkimukseksi. Tällä pyritään poistamaan väärin positiiviseksi tulkitut tulokset, jotka aiheutuvat siitä, kun DFS-kuvio sekoitetaan mikroskopoitaessa homogeeniseen tai homogeenisen ja täplikkeen kuvion muodostamaan sekakuvioon tai kun S -DNA ja S -ENA jatkotutkimukset ovat negatiivisia.

Pyrin vastaamaan seuraavaan kysymykseen opinnäytetyöni puitteissa:

1. Toimiiko reagenssipaketti valmistajan osoittamalla tavalla?
2. Onko käyttämässäni näytemateriaalissa DFS70 positiivisia näytteitä?
3. Miten hyvin DFS70 positiiviset näytteet pystytään havaitsemaan S -ANA tutkimuksessa?

### 3 Menetelmät

S-ANA menetelmää on käytetty jo pitkään autoimmuunisairauksien diagnostiikassa (Fritzler 2011). Positiivisia tuloksia on tutkuttu DNAAb ja ENAAb menetelmillä tarkentamaan hoitovastetta ja taudin ennustetta. Taudin edetessä kuvion tai titterin muutokset tai uusien vasta-aineiden ilmaantuminen kertovat taudin kulusta (Kurki 1992, Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim).

Kaikki mittausten ohjeet ovat joko Yhtyneet Medix laboratorion tai INOVA Diagnostics –yhtiön laatimia. Osaa ohjeista on hiukan lyhennetty tai jätetty tarkoituksella vaillinaiseksi, jotta yrityssalaisuudet eivät paljastu.

#### 3.1 Tumavasta-ainetutkimus S -ANA

S –ANA (serum antinuclear antibody) tutkimus on epäsuora immunofluoresenssitutkimus. Tutkimuksen periaate on, että näytteessä olevat tumavasta-aineet sitoutuvat objektilasilla kasvatettuihin HEp-2 solulinjan soluihin. Sitoutuneet autovasta-aineet osoitetaan FITC-konjugoidulla antihumaani IgG –seerumilla.

##### 3.1.1 Suorittaminen

Näyte saapuu laboratorioon yleensä sentrifugoituna ja eroteltuna. Mikäli näytettä ei ole kuitenkaan eroteltu, se erotellaan laboratoriossa. Näytteen ollessa erittäin lipeeminen, hemolyyttinen tai bakteerikontaminoitunut, sitä ei voida analysoida. Näyte säilyy analyysikelpoisena jääkaappilämpötilassa (+2 - 8°C) viikon ja pakkasessa (-18°C) pidempään.

Potilasnäytteet sekä positiivinen ja negatiivinen kontrolli laimennetaan 1:320 laimennuslevylle. Substraattilasit otetaan huoneenlämpöön. Näytettä pipetoidaan substraattilasille 30 µl / lasin kaivo. Lasia inkuboidaan 30 minuuttia kosteassa kammiossa huoneenlämmössä. Lasi huuhdellaan puskuriliuoksessa ja pestään ravistelijassa kahteen kertaan. Tässä vaiheessa on erittäin tärkeää, ettei lasi pääse kuivumaan. Lasille pipetoidaan konjugaattia 50 µl / kaivo ja sitä inkuboidaan pimeässä 30 minuuttia. Tämän jälkeen suoritetaan taas kaksi pesua pesupuskurissa hiukan pidempään kuin aikaisemmin. Pesun jälkeen lasille kiinnitetään väliainetta (mounting media) ja peitinlasi

asetetaan lasille varoen ilmakuplien muodostamista lasien väliin. Lasia säilytetään jääkaapissa, kunnes se katsotaan pimeässä huoneessa fluoresenssimikroskoopilla. (Havana, Marika 2012, Työhje.)

### 3.1.2 Tulosten tulkinta

Näyteprosessista saadaan lasi, jolla näkyvät positiivinen ja negatiivinen kontrolli sekä potilasnäyte laimennettuna 1:320. Näytteen titraamisella eli laimentamisella pyritään löytämään laimein näytepitoisuus, jossa tulos on selkeästi positiivinen. Lasi katsotaan fluoresenssimikroskoopilla pimeässä huoneessa. Tulkinnan tekee tulosten lukemiseen perehdytetty laboratorionhoitaja. Näytteen ollessa positiivinen, suoritetaan suoraan kaksi seuraavaa jatkolaimennusta 1:1280 ja 1:5000. Epäselvissä tapauksissa tulkinnassa auttaa tutkimukseen perehtynyt lääkäri.

Vastauksessa mahdolliset laimennokset ovat 1:320, 1:1280 ja 1:5000. Ensimmäisellä laimennoksella negatiiviseksi tulkitusta näytteestä ei tarvitse tehdä pienempiä laimennoksia. Se vastataan negatiiviseksi <320 laimennoksella. Näytteen positiivisuuden voimakkuus merkitään yhdellä tai kahdella + -merkillä. Positiivisesta näytteestä tehdään kaksi seuraavaa laimennosta. Tulos vastataan sen titterin voimakkuuksisena, joka on ollut vielä selkeästi tunnistettavissa positiiviseksi. Esimerkiksi, jos näytteessä näkyy homogeeninen kuvio laimennoksessa 1:320, tehdään uudelle lasille samasta näytteestä laimennokset 1:1280 ja 1:5000. Mikäli homogeeninen kuvio näkyy 1:1280 laimennoksessa, mutta ei 1:5000 laimennoksessa, tuloksen titteriksi laitetaan 1280 ja kuvioksi homogeeninen. Mikäli kuvion vahvuus on 1:5000 titterissä vielä ++ voimakkuuksinen tulos merkitään >5000.

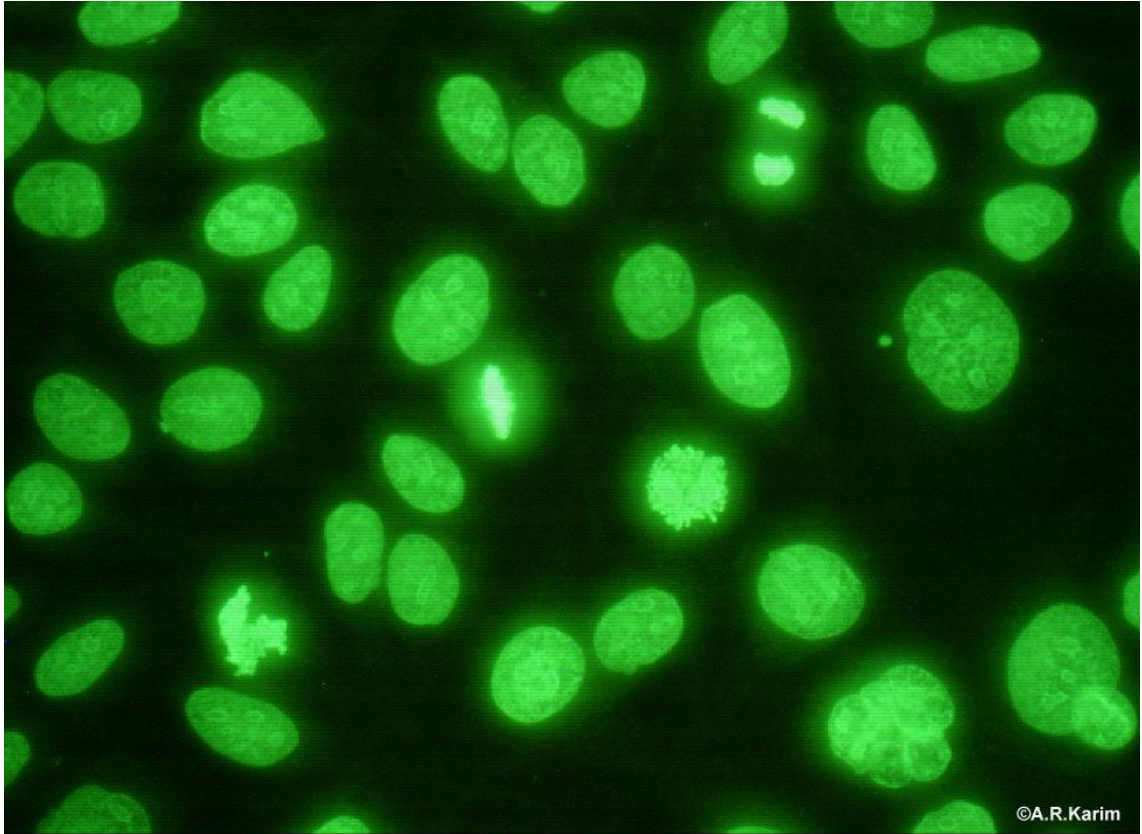
Tutkimuksessa mahdollisesti ilmi tulevia kuvioita on useita. Näytteestä vastataan, onko värjäyskuvio jokin näistä neljästä yleisimmästä:

1. Homogeeninen
2. Täplikäs
3. Sentromeerinen
4. Nukleolaarinen

Lisäselvityksenä voidaan vastata myös muita selkeästi tulkittavissa olevia kuvioita.



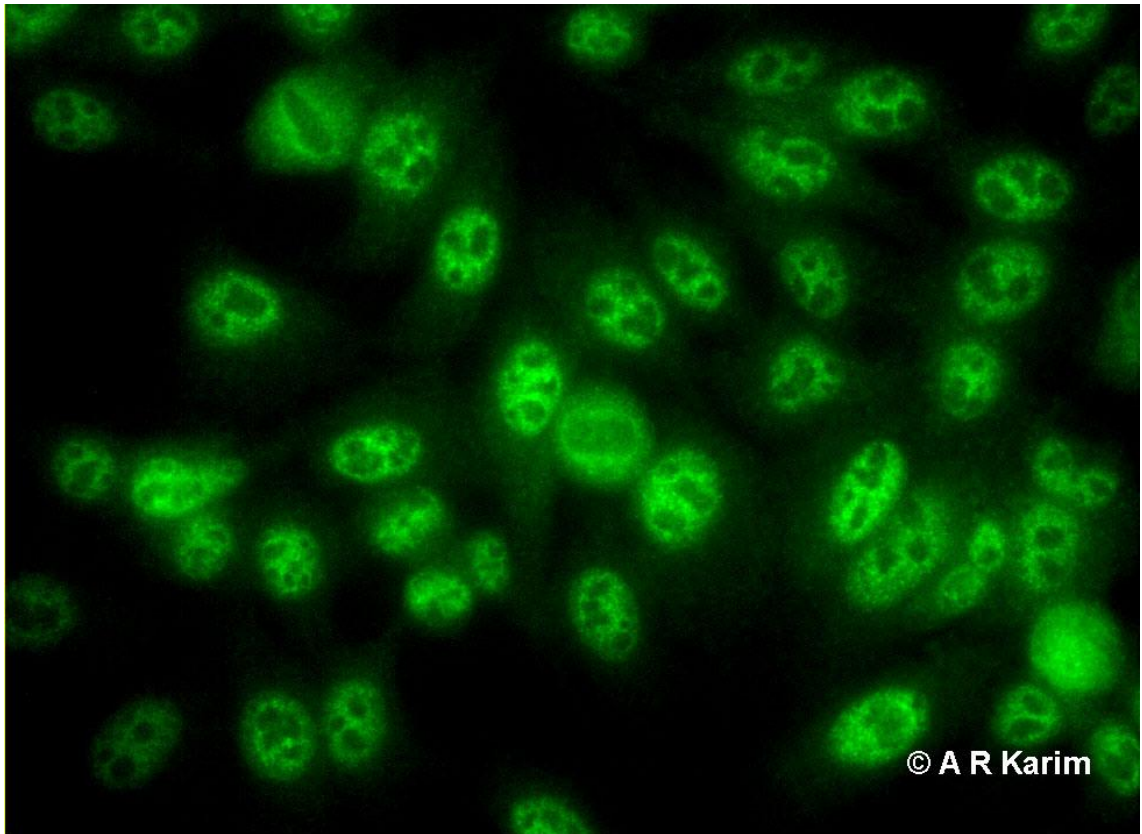
Tässä on esitetty opinnäytetyön kannalta oleellimmat kuviot kuvina. Jokaisen kuvan alapuolella on selitys siitä, mikä kuvio kuvassa näkyy ja mihin autoimmuunisairauksiin kuvion esiintyminen potilasnäytteessä voi viitata.



Kuvio 1. Homogeeninen tumavasta-aine kuvio (University of Birmingham 2013)

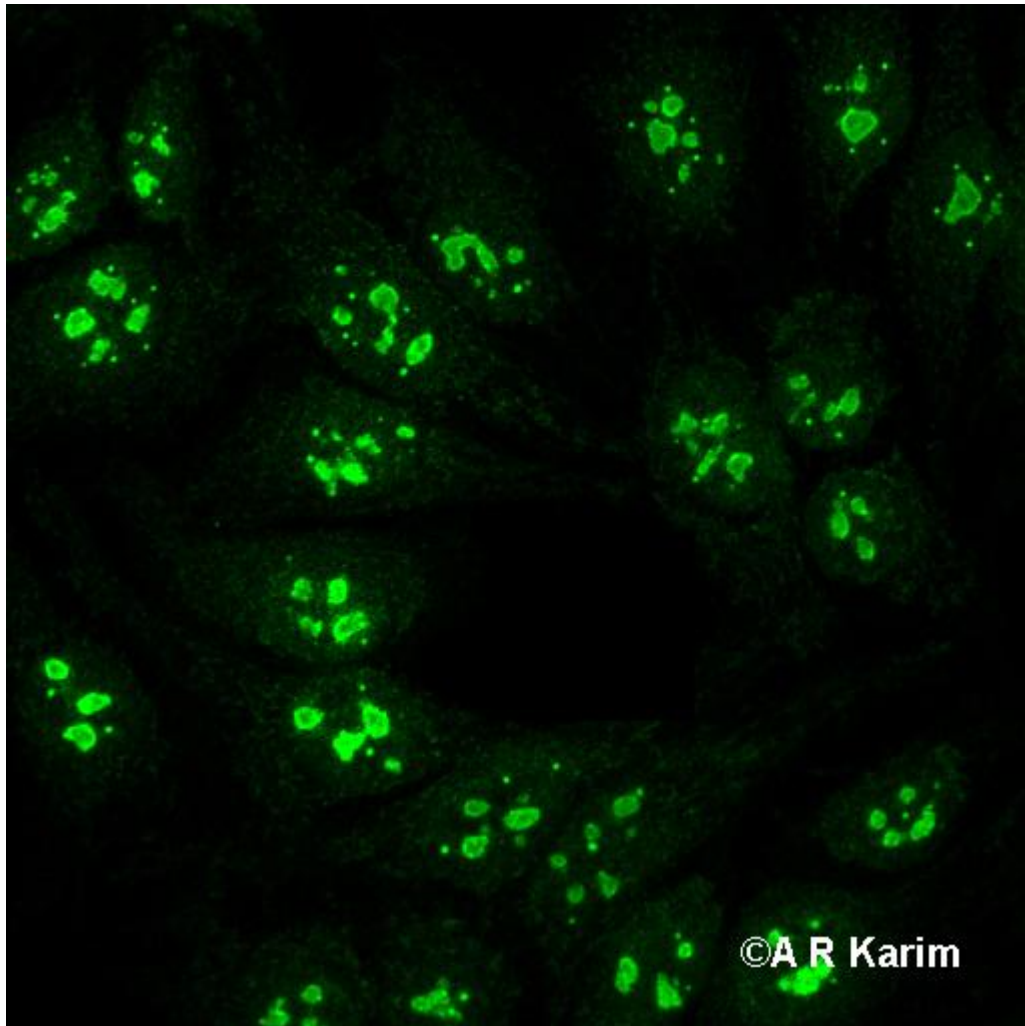
Homogeeninen kuvio on värjännyt koko solun tasaisesti. Jakautuvassa solussa kromosomit värjäytyvät voimakkaasti. Kuvion esiintyminen viittaa yleensä SLE:hen.

Sekakuviossa (homogeeninen/täplikäs) esiintyy piirteitä sekä homogeenisesta että täplikästä kuviosta. Mikroskooppinäkymässä voidaan nähdä myös selkeästi kahta erillistä kuviota.



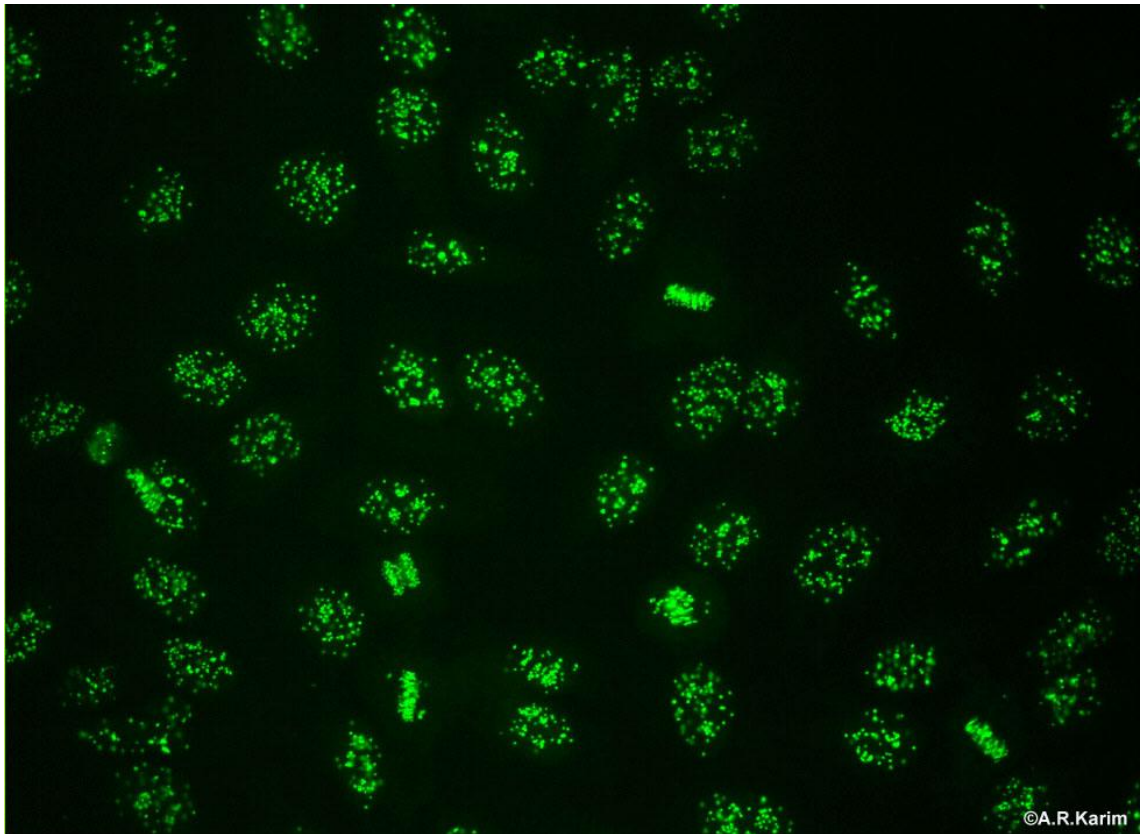
Kuvio 2. Täplikäs tumavasta-ainekuvio (University of Birmingham 2013)

Täplikkäässä kuviossa on selvästi näkyvissä tummia täpliä solun sisällä. Solut ovat hiukan pesusienimäisen näköisiä. Kuvion esiintyminen antaa viitteitä SLE:stä, Sjögrenin syndroomasta tai systeemisestä skleroosista.



Kuvio 3. Nukleolaarinen tumavasta-aine kuvio (University of Birmingham 2013)

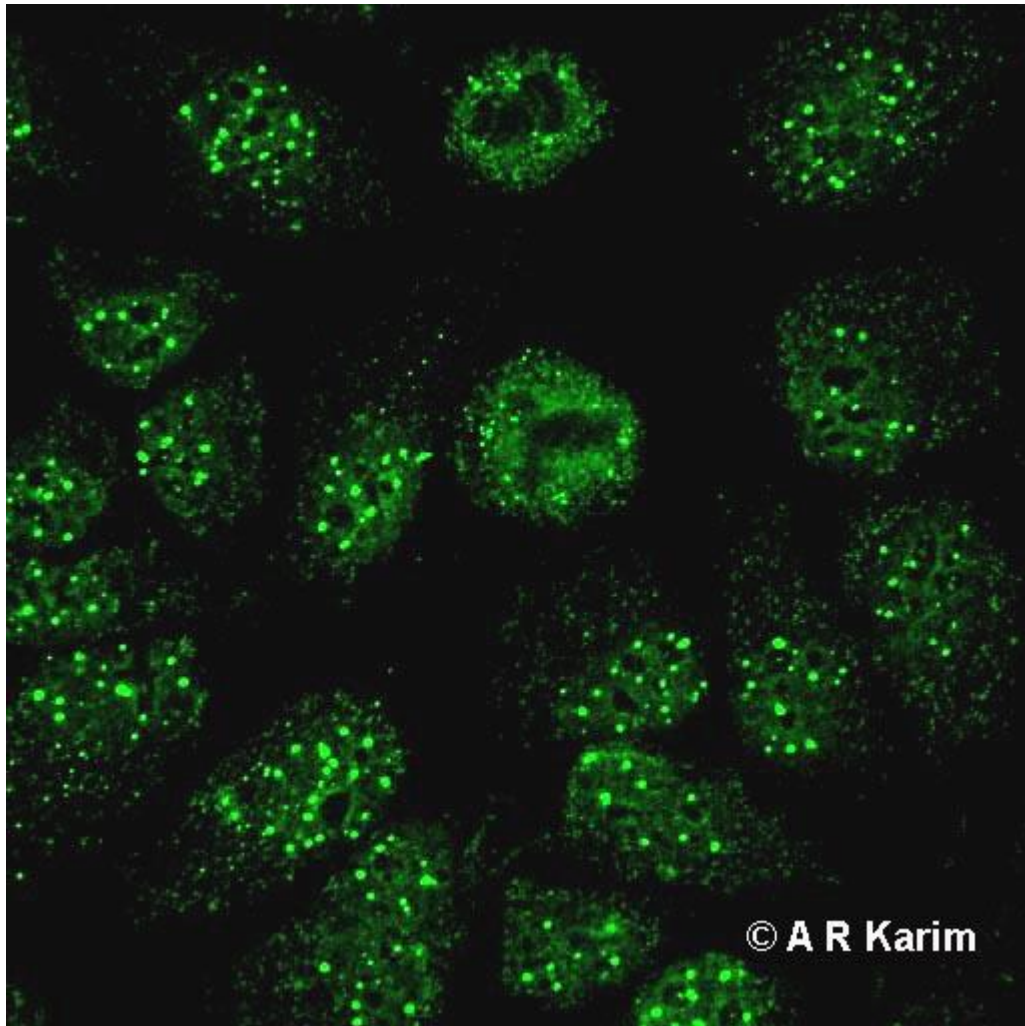
Nukleolaarisia kuvioita on useaa hiukan toisistaan poikkeavaa. Tyypillistä on kuitenkin tumajyvästen värjäytyminen. Nukleolaarisen kuvion löytyminen viittaa systeemiseen skleroosiin.



Kuvio 4. Sentromeerinen tumavasta-aine kuvio (University of Birmingham 2013)

Sentromeerisille vasta-aineille on tyypillistä useat hohtavat pisteet solussa, joita on 46 kappaletta / solu.





Kuvio 5. Pistemäinen tumavasta-aine kuvio (University of Birmingham 2013)

Pistemäistä vasta-ainekuviota on kahta erilaista sen mukaan, montako hohtavaa pistettä solun sisällä on. Mikäli niitä on vähemmän kuin kuusi, kuvio viittaa aktiiviin hepatiittiin ja mikäli pisteitä on 6-10, kuvio viittaa Sjögrenin syndroomaan tai SLE:en. Kuvio on hiukan harvinaisempi kuin neljä pääasiassa vastattavaa kuviota.

(University of Birmingham 2013.)

### 3.2 DFS-70

DFS-70 määrittäminen pohjautuu ELISA-menetelmään. Kuoppalevyn kuoppiin on sidottu DFS70 antigeenia, johon potilasseerumissa mahdollisesti olevat DFS70 vasta-aineet sitoutuvat. Sitoutumaton näyte pestään pois ja sitoutuneisiin vasta-aine – antigeenipareihin liitetään entsyymileimattua antihumaani IgG:tä. Sitoutumaton leima pestään pois

ja etsyymiaktiivisuus mitataan spektrofotometrillä kromogeenisen substraatin lisäämisen jälkeen. Mittaus tapahtuu 450nm aallonpituudella.

### 3.2.1 Suorittaminen

Potilasnäytteen tulee olla eroteltua seerumia. Näyte ei saa olla voimakkaasti lipeeminen tai hemolyyttinen, bakteerikontaminoitunut tai lämpökäsitelty. Näytteessä ei myöskään saa olla silmin nähtäviä partikkeleita. Näyte säilyy analyysikelpoisena jääkaappilämpötilassa (+2- 8°C) kaksi vuorokautta ja pidempään pakastettuna (-20°C). Näytteen olisi hyvä olla huoneenlämpöinen analysoitaessa.

DFS-70 tutkimus on INOVA Diagnostics –yhtiön uusi määrittely, jonka avulla tumavasta-aine seulonnan tuloksia voidaan tarkentaa. Määrittelyssä näytelevyn kuoppiin on sidottu DFS70 antigeenia. Laimennetut kontrollit ja potilasseerumit lisätään erillisiin kuoppiin, joissa mahdolliset vasta-aineet DFS70- antigeenille voivat kiinnittyä. Inkuboinnin jälkeen kiinnittymätön näyte pestään pois ja entsyymileimattua antihumaani IgG konjugaattia lisätään jokaiseen kuoppaan. Tämä sitoutuu pimeässä tapahtuvan inkubaation aikana antigeeni-vasta-aine –komplekseihin, jotka ovat kiinnittyneet kuoppien pohjaan. Entsyymileimattu konjugaatti pestään pois ja kaivoihin lisätään kromogeeninen substraatti, jonka jälkeen mitataan substraatin muodostama väri spektrofotometrisesti. Potilasnäytteiden tulokset lasketaan kaavalla, joka käyttää hyväksi heikon positiivisen kontrollin absorbansseja.

### 3.2.2 Tulosten tulkinta

Potilasnäytteiden absorbanssia verrataan heikosti positiivisen kontrollin absorbanssiin. Vastaus lasketaan seuraavalla kaavalla: potilaan absorbanssi jaettuna heikon positiivisen kontrollin absorbanssien keskiarvolla kerrottuna 38,9 yksiköllä. Tulos vastataan yksikköinä (units). 38,9 yksikköä on reagenssivalmistajan ilmoittama kontrollin pitoisuus. Tulos on negatiivinen kun laskun tulos on <20 yksikköä, heikko positiivinen 20-39 yksikköä, positiivinen 40-80 yksikköä ja vahva positiivinen >80 yksikköä.

### 3.3 DNA-vasta-ainetutkimus ja tuman liukoiset vasta-aineet (S -DNAAb ja S -ENAAb)

Sekä S -DNAAb että S -ENAAb määrittämiä käytetään tarkentamaan S -ANA mittauksesta saatuja positiivisia tuloksia. Jatkotutkimuspaketti selvitetään tumavasta-ainetutkimuksesta saadun kuvion perusteella. Tutkimuksilla selvitetään tumavasta-aineiden spesifiteettiä, taudin hoitovastetta ja ennustetta. Näitä tutkimuksia käsitellään hiukan suppeammin kuin aikaisempia, sillä nämä eivät ole tämän opinnäytetyön kannalta niin tärkeitä. Tässä opinnäytetyössä DFS-70 tulokset tarkastetaan näillä menetelmillä. Kyseiset määrittäykset tehdään Yhtyneet Medix laboratoriot Oy:ssä eivätkä ne sisälly muutoin tähän opinnäytetyötutkimukseen. Molemmat määrittäykset suoritetaan Phadia 250 -analysaattorilla.

#### 3.3.1 DNA vasta-ainetutkimus (S -DNAAb)

S –DNAAb (deoxyribonucleic acid antibody) on

Fluoroentsyymi-immunomenetelmä (FEIA), jossa mitataan kvantitatiivisesti vasta-aineita kaksisäikeistä denaturoimatonta (natiivia) plasmidi-DNA:ta vastaan (dsDNA).

(Laboratoriokäsikirja, Yhtyneet Medix laboratoriot 2013)

Tutkimuksella selvitetään SLE:n vaikeusastetta. Se saattaa antaa viitteitä muista autoimmuunisairauksissa yhdessä muiden tutkimusten kanssa.

#### 3.3.2 Tuman liukoiset vasta-aineet (S -ENAAb)

S –ENAAb (extractable nuclear antigen antibody) tutkimuksen menetelmä on fluoroentsyymi-immunologinen (FEIA) menetelmä. Menetelmässä on entsyymileima, joka pilkkoo substraatin lisäyksen jälkeen substraatista fluoresoivan tuotteen, jonka pitoisuutta mitataan. Tutkimukseen kuuluu osatutkimuksia, jotka antavat tarkempia viitteitä autoimmuunisairaudesta, joka voi olla kyseessä. Vasta-aineita on havaittu osassa autoimmuunisairauksia.

Mittauksessa suoritetaan ensin seulonta, jolloin käytössä olevissa kuoppalevyissä on antigeeneja kaikkiin tutkittaviin vasta-aineisiin. Mikäli seulonnassa saadaan positiivinen tulos, näytteestä suoritetaan tarkka erottelu, jossa määritetään erikseen seuraavat vasta-aineet:

1. U1-RNP
2. Sm
3. SS-B (La)
4. SS-A (Ro)
5. Jo-I
6. Scl-70
7. Sentromeeri

Taulukossa 1. on esitetty osatutkimuksen kliininen tunnus, antigeenin nimi sekä sen esiintyvyys autoimmuunisairauksissa prosentteina sairastuneista. Taulukko on lainattu sellaisenaan Pekka Kurjen 1992 Lääketieteellisen Aikakauskirja Duodecimin artikkelista Tumavasta-aineiden ennustearvo reumataudeissa.

Taulukko 1. Vasta-aineiden esiintyminen eri autoimmuunisairauksissa Kurki, Pekka 1992

Kliininen tunnus	Antigeenimolekyyli tai partikkeli	Vasta-aineiden esiintyvyys
Natiivi-DNA	Kaksoiskiertainen DNA	50 % SLE:ssä
Histoni	Histoni H2B-H3A, H3-H4-kompleksit	100 % lääkeaineen indusoimassa lupuksessa
U1-RNP	U1-RNP-partikkeli	100 % MCTD:ssä
Sm	U-RNP-partikkelit	20 % SLE:ssä
SS-B(La)*)	RNA-proteiini	70 % primaarisessa Sjögrenin syndroomassa
SS-A(Ro)**)	Ro-RNP-partikkeli	90 % primaarisessa Sjögrenin syndroomassa > 90 % kongenitaalisessa eteis-kammiokatkoksessa
Jo-I	"Histidyl-transfer"-RNA-syntetaasi	30 % polymyositissa
Scl-70	Topoisomeraasi I	70 % systeemisessä skleroosissa
Sentromeeri	19, 80 ja 140 kD:n kinetokoriantigeenit	70 % CREST-syndroomassa

\*) Sjögrenin syndrooman B (La) vasta-aineet

\*\*) Sjögrenin syndrooman A (Ro) vasta-aineet



## 4 Työn suorittaminen

Työ suoritettiin Yhtyneet Medix laboratorioden immunologian laboratorion tiloissa toukokuussa 2012. Suorittamiseen käytettiin heidän omia laitteitaan ja reagenssejaan. DFS-70 tutkimuksen reagenssit oli toimittanut INOVA Diagnostics –yhtiö.

### 4.1 Näyttemateriaali

Tutkimuksessa käytetyt näytteet ovat Yhtyneet Medix Laboratorion omia potilasnäytteitä, joista on aikaisemmin analysoitu ja vastattu S -ANA –tutkimus ja ne ovat positiivisia jonkin tumavasta-aineen suhteen. Näytteitä oli kerätty pari tutkimusta edeltävää kulkua. Näytteet numeroitiin juoksevasti S -ANA tutkimustuloksen kuvion perusteella. Yritimme saada samanlaisia kuvia samaan ajoon, jolloin näytteistä saatuja tuloksia on tulosten tulkintavaiheessa mahdollisimman helppoa taulukoida. Tutkimuksessa oli käytettävissä 105 näytettä.

### 4.2 Mittausten suorittaminen

Laboratoriossa oli tehty esitutkimus maaliskuussa 2012. Silloin katsottiin muutama potilasnäyte DFS-70 menetelmällä ja todettiin menetelmän toimivuus. Minut perehdyttiin laboratoriossa tarvittavan laitteiston käyttämiseen. Perehdyin työohjeeseen, jotta ymmärrän sen varmasti oikein ja osaan tehdä tarvittavat laimennokset oikein. Suoritin myös pipetointiharjoituksia valvotusti ennen tutkimuksen suorittamisen aloitusta.

Numeroin näytteet ja kirjasin taulukkoon juoksevan näytenumeron, aiemmin vastatun tumavasta-aine kuvion sekä titterin. Esimerkki osasta työstönumerotaulukosta taulukossa 2. Pidin näytteet jäissä ja varoin sulattamasta niitä. Pyrin katsomaan samaa kuviota olevat positiiviset näytteet peräkkäisiksi, jolloin tulosten tulkinta helpoittuisi. Taulukossa on nähtävillä omilla sarakkeissaan näytteiden pienin laimennos eli titteri, jossa tulos on positiivinen, näytteelle vastattu kuvio sekä antamani työstönumero. Ensimmäisen näytteen erottamiseksi muista annoin sille tunnuksen N.1. Näyte haluttiin erottaa muista näytteistä, koska sitä oli käytetty jo esitutkimuksessa, jossa se oli löydetty DFS70 positiiviseksi. Näytettä päätettiin siksi käyttää kontrollina kaikissa suorittamistani ajoissa.

Taulukko 2. Esimerkki näytteiden työstönumeroinnista

Työstönumero	Titteri	Kuvio
N.1	5000	Täplikäs
2	320	Sekakuvio
3	320	Sekakuvio
4	320	Sekakuvio
5	320	Sekakuvio
6	320	Sekakuvio
7	320	Sekakuvio
8	320	Sekakuvio
9	320	Sekakuvio
10	320	Sekakuvio
11	320	Sekakuvio
12	320	Sekakuvio
13	320	Sekakuvio
14	320	Sekakuvio
15	320	Sekakuvio
16	1280	Sekakuvio
17	320	Homogeeninen
18	1280	Homogeeninen
19	320	Homogeeninen
20	1280	Homogeeninen
21	1280	Homogeeninen
22	320	Homogeeninen

Tein pipetointitaulukot, joihin merkkasin kuoppalevyn numerot ja kirjaimet sekä näytteet oikealle paikalleen. Otin samana päivänä ajoon menevät näytteet sulamaan ajopäivän aamuna huoneenlämpöön. Laitoin työpisteen valmiiksi ja valmistin reagenssit ja pesuliukset valmistajan ohjeiden mukaisesti. Taulukossa 3. on esimerkki toteutuneesta kontorollien ja näytteiden pipetointikaaviosta ensimmäisestä ajosta.

Taulukossa ruudut kuvaavat kuoppalevyn kuoppia. Kuopan sisälle on kirjoitettu näyte, joka siinä ajetaan. Reunoilla olevat kirjaimet A-H ja numerot 1-12 kuvaavat kuoppale-

vyyn kaiverrettuja merkintöjä, jotka auttavat hahmottamaan näytteen paikan ja pitämään työskennellessä kuoppalevyn aina samoin päin. Näytteet pipetointiin pystyri vi kerrallaan kuopasta A1 kuoppaan H1, kuopasta A2 kuoppaan H2 ja edeten riville 6 asti samalla tavalla niin, että rinnakkaiset näytteet ovat peräkkäin. Kaksi ensimmäistä pystyri viä sisältävät negatiivisen kontrollin (NEG), heikon positiivisen kontrollin (LOW POS) korkean positiivisen kontrollin (HIGH POS) ja reagenssivalmistajalta saadut kolme reagenssipakettiin kuulumatonta positiivista näytettä (AB32, AB44 ja PG24) sekä esitutkimuksessa löydetyn positiivisen näytteen N.1, jota käytettiin laboratorion omana kontrollina. Lopuissa kuopissa on analysoitavien näytteiden työstönumerot paikoilla joihin ne on pipetoitu. Sarjan viimeisenä näytteenä on uudelleen N.1, jolla kontrolloidaan pipetoinnin vaikutusta inkubaatioaikaan. Tyhjät ruudut kuvaavat tyhjäksi jätettyjä kuoppia kuoppalevyllä.

Taulukko 3. Pipetointitaulukko kontrollien ja näytteiden pipetoinnista kuoppalevyllä 21.5.2012 ajosta 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NEG	AB32	3	7	11	15						
B	NEG	AB32	3	7	11	15						
C	LOW POS	AB44	4	8	12	16						
D	LOW POS	AB44	4	8	12	16						
E	HIGH POS	PG24	5	9	13	17						
F	HIGH POS	PG24	5	9	13	17						
G	N.1	2	6	10	14	N.1						
H	N.1	2	6	10	14	N.1						

Sekoitin sulaneet näytteet Vortexilla ja tein laimennukset ohjeen mukaan 5 µl näytettä ja 500 µl puskuriliuoksta erillisiin muovisiin koeputkiin, jotka numeroin näytenuumeroiden mukaisesti. Vortexoin laimennokset uudelleen ennen pipetointia kuoppalevyille. Pipetoitin 100 µl laimennettuja näytteitä ja kontroleja kuoppalevyllä rinnakkaisina niin, että

samaa näytettä tulee kahteen erilliseen kuoppalevyyn. Pipetoin vain puoli kuoppalevyä kerrallaan, jotta inkubaatioajat pysyivät rajojen sallimissa puitteissa. Levyä inkuboitiiin peitettynä huoneenlämmössä 30 minuuttia. Inkubaatioajan kuluttua näytteet pestään pesupuskurilla Thermo Scientific Wellwash Versa -pesurilaitteella 3 kertaa ja taputellaan levy vielä kuivaksi. Kaivoihin lisätään 100 µl konjugaattia, jonka annetaan inkuboitua taas puoli tuntia huoneenlämmössä. Toisen inkubaation jälkeen suoritetaan samanlainen pesu kuin ensimmäiselläkin kerralla ja taputellaan levy kuivaksi imupaperiin. Kaivoihin lisätään 100 µl substaattia, jonka jälkeen levyä inkuboitiiin valolta suojattuna tummassa rasiassa vetolaatikossa huoneenlämmössä puoli tuntia. Viimeisen inkubaation jälkeen lisätään 100 µl reaktion pysäyttävää liuosta, ja kuoppien absorbanssit luetaan Labsystems Multiskan Plus -spektrofotometrilaitteella 450nm aallonpituudella.

Kirjasin absorbanssit tietokoneelle ja laskin jokaisen näytteen absorbanssien keskiarvon. Laskin myös heikon positiivisen kontrollin absorbanssit. Tuloksen kaava on näytteen absorbanssi jaettuna heikon positiivisen absorbanssilla kerrottuna 38,9 yksiköllä. Syötin tämän kaavan excel-taulukkoon ja laskin näytteiden tulokset kaavalla.

Tein positiivisista tuloksista uudelleen S-ANA määrityslasit, joiden tulokset menivät tulkittaviksi lääkäriille ja kemistille. Mittaukset suoritin valvotusti ohjeiden mukaan aiemmassa kappaleessa kuvatulla menetelmällä. DFS70 positiivisista näytteistä laboratoriossa tehtiin myös DNA ja ENA vasta-ainemääritykset analysaattorilla.

#### 4.3 Luottettavuus ja eettisyys

Aluksi näytteiden käsittelyssä näytteillä on potilaiden henkilötunnukset. Minua sitoo allekirjoittamani vaitiolovelvollisuus. Tutkimustuloksilla ei ole vaikutusta näytteistä jo aiemmin vastattuihin tuloksiin. Työvaiheessa ja raportissa näytteet on numeroitu juoksevilla numeroinnilla, jolloin tutkimuksen aikana näytteen alkuperä ei ole tunnistettavissa. Valmiissa työssä käsitellään vain näytenumeroita. Potilaiden lupaa näytteiden käyttöön ei tarvita, sillä kyseessä on uuden menetelmän käyttöönottotutkimus.

Koska reagenssivalmistaja INOVA Diagnostics -yhtiön mukaan DFS-70 tutkimuksen tulokset eivät ole lineaarisia samassa suhteessa näytteen laimennokseen, halusimme varmistaa tämän käytännössä. Teimme kahdesta löytämästämme voimakkaasti DFS70 positiivisesta näytteestä laimennossarjat joihin laitoimme laimennokset 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16. Varmistimme, että tulokset eivät tosiaan ole lineaariset. Laimennossarjan tulokset on esitetty kahdessa seuraavassa taulukossa 4 ja 5. Ylhäällä on näytenumero vasemmassa reunassa kerrotaan laimennokset. Taulukossa esitetään näytteen rinnakkaisista ajoista saadut absorbanssit sekä niiden keskiarvot ja DFS- määrityksen tulos yksikköinä. Lisäksi oikealla on laskennallinen odotusarvo tuloksille, mikäli ne laskisivat lineaarisesti laimennoksen mukaan. Alareunassa on vielä absorbanssit ajossa olleelle heikolle positiiviselle kontrollille, jonka avulla DFS-70 tulokset on laskettu.

Taulukko 4. Taulukko 4. Näytteen numero 42 laimennossarjan tulokset

	Näyte	42				
Laimennos		abs1	abs2	ka	tulos	laskennallinen odotus
alkuperäinen		1,816	1,787	1,8015	244,6	
1:02		1,39	1,337	1,3635	185,1	122,30
1:04		1,144	0,981	1,0625	144,3	61,15
1:08		0,672	0,668	0,67	91,0	30,58
1:16		0,489	0,452	0,4705	63,9	15,29
	LOW POS	0,243	0,33	0,2865		

Taulukko 5. Taulukko 5. Näytteen numero 33 laimennossarjan tulokset

	33				
Laimennos	abs1	abs2	ka	tulos	laskennallinen odotus
alkuperäinen	1,199	1,22	1,2095	164,2	
1:02	0,862	0,833	0,8475	115,1	82,1
1:04	0,486	0,487	0,4865	66,1	57,5
1:08	0,3	0,29	0,295	40,1	33,0
1:16					
	LOW POS	0,232	0,427	0,3295	

Jokaisessa ajossa oli käytössä reagenssipakettiin kuuluvat negatiivinen, korkea positiivinen ja heikko positiivinen kontrolli. Lisäksi käytimme esitutkimuksessa positiiviseksi todettua näytettä N.1 jokaisessa ajossa omana kontrollina. Jokainen näyte pipetoitiin rinnakkaisena kahteen peräkkäiseen kuoppaan paitsi viimeisessä ajossa, johon mennessä kontrollien toistettavuus oli todettu ja kuoppalevyn kuopat meinasivat loppua

kesken. Kontrollien tulokset kerättiin erilliseen taulukkoon ja kemisti tarkasti, etteivät poikkeamat ole liian suuria rinnakkaisissa pipetoinneissa tai eri ajojen väleissä. Sarjan sisäistä vaihtelua kontrolloitiin pipetoimalla sama näyte samassa ajossa kahteen eri kohtaan kuoppalevyllä sekä pipetoimalla yksi näyte useaan kertaan peräkkäin. Tämä näyte oli työstönumeroltaan 32 ja sen tulokset on esitetty taulukossa 6. Taulukossa on näkyvissä kuopat, joille näytteet on pipetoitu sekä laskettu DFS-70 mittauksen tulokset kahdesta rinnakkaisesta ajosta. Lisäksi on laskettu absorbanssien keskiarvo, keskihajonta (SD) ja CV% sekä DFS-70 mittaustulosten keskiarvo, keskihajonta (SD) ja CV%.

Taulukko 6. Näytteen 32 absorbanssit sarjan sisäisenä kontrollina

Kuoppalevyn paikka	Näyte 32 Absorbanssi	DFS-70 tulos
6G	0,485	
6H	0,443	54,8
7A	0,482	
7B	0,436	54,2
7C	0,618	
7D	0,382	59,0
7E	0,408	
7F	0,396	47,5
7G	0,523	
7H	0,416	55,4
Absorbanssien keskiarvo	0,459	
Keskihajonta SD	0,071	
Absorbanssien CV%	15,5	
Ajon LOW POS KA	0,3295	
DFS-70 KA	54,2	
DFS-70 SD	4,2	
DFS-70 CV%	7,8	

Kontrollien tulokset esitetty taulukoissa 7, 8 ja 9. Vasemmalla numeroina ajon numero sekä ajossa saatujen rinnakkaisten pipetointien absorbanssit sekä niiden keskiarvot. Lisäksi taulukossa on laskettu absorbanssien keskihajonta (SD) sekä CV% sekä DFS tulos sekä sen keskihajonta ja CV% paitsi heikon positiivisen kontrollin kohdalla.

Taulukko 7. Negatiivisen kontrollin tulokset kaikissa näyteajoissa

	NEG			
	Abs 1	Abs 2	KA	DFS tulos
1.	0,054	0,059	0,0565	5,8
2.	0,054	0,06	0,057	6,5
3.	0,049	0,051	0,05	4,9
4.	0,063	ei mitattu	0,063	8,6
5.	0,053	ei mitattu	0,053	6,3
	KA kaikist	0,055375		
	ABS SD	0,0048088		
	ABS CV%	8,7		
	DFS KA	6,4		
	DFS SD	2,9		
	DFS CV%	45,0		

Taulukko 8. Korkean positiivisen kontrollin tulokset kaikissa näyteajoissa

	HIGH POS			
	Abs 1	Abs 2	KA	DFS tulos
1.	0,836	0,807	0,8215	84,7
2.	0,824	0,806	0,815	92,8
3.	0,883	0,843	0,863	84,2
4.	0,864	ei mitattu	0,864	117,3
5.	0,767	ei mitattu	0,767	90,6
	KA kaikista	0,82875		
	ABS SD	0,036386		
	ABS CV%	4,4		
	DFS KA	93,9		
	DFS SD	13,6		
	DFS CV%	14,5		



Taulukko 9. Heikon positiivisen kontrollin absorbanssit kaikissa näyteajoissa

	LOW POS				
	Abs 1	Abs 2	KA	SD	CV%
1.	0,459	0,296	0,3775	0,043528	12,6
2.	0,396	0,287	0,3415		
3.	0,479	0,318	0,3985		
4.	0,243	0,33	0,2865		
5.	0,232	0,427	0,3295		
		KA kaikista	0,3467		

Tutkimuksen kulkua oli harjoiteltu valvotusti. Kaikki käytettävät pipetit olivat kalibroituja valmistajien ohjeiden mukaisesti. Työtapa noudatti laboratorion aseptisia ohjeita. Pipetointi suoritettiin rauhallisessa paikassa, jolloin pystyin keskittymään pipetointiin ja välttämään inhimillisiä virheitä. Mikään käytetyistä liuoksista ei ollut mennyt vanhaksi. Käytetyt laitteistot oli huollettu huolto-ohjelmien mukaisesti, eikä niissä ilmennyt ongelmia mittausten suorittamisen aikana.

Esitutkimuksessa positiiviseksi löydetystä näytteestä N.1 tehtiin useita määrittäyksiä. Se toimi sisäisenä kontrollina jokaisessa ajossa ja yhdessä ajossa sitä käytettiin pipetoinnin kontrollina siten, että näyte pipetoitiin sarjan alkuun ja loppuun. Taulukossa 10 on nähtävissä näytteen N.1 tulokset ja paikat kuoppalevyillä kaikissa ajoissa. Lisäksi rinnakkaisten näytteiden absorbanssit ja niiden keskiarvo sekä kyseessä olleen ajon heikon positiivisen kontrollin absorbanssit. Taulukon alareunaan on laskettu DFS-70 tulosten sekä absorbanssien keskiarvo, keskihajonta ja CV%.

Taulukko 10. Näytteen N.1 tulokset kaikissa ajoissa

Näyte N.1							
Kuoppalevyn paikka	Absorbanssi 1	Absorbanssi 2	Absorbanssien ka	LOW POS 1	LOW POS 2	LOW POS ka	Vastaus / l
1. 1G & 1H	0,374	0,25	0,312	0,296	0,459	0,3775	32,2
2. 6G & 6H	0,237	0,201	0,219	0,296	0,459	0,3775	22,6
3. 1G & 1H	0,317	0,232	0,2745	0,396	0,287	0,3415	31,3
4. 1G & 1H	0,374	0,253	0,3135	0,479	0,318	0,3985	30,6
5. 1E & 1F	0,26	0,251	0,2555	0,243	0,33	0,2865	34,7
6. 1E & 1F	0,223	0,216	0,2195	0,232	0,427	0,3295	25,9
Vastausten KA	29,5		Absorbanssien KA	0,266			
SD	4,5		Absorbanssien SD	0,058			
CV%	15,1		Absorbanssien CV%	21,9			

## 5 Tulokset

105 tutkimusnäytteestä päätimme yhdessä biokemisti Marika Havanan kanssa jättää 4 reagenssipaketin näytekuppien vähyden takia. Analysoin siis 101 näytettä. Näistä 18 oli positiivisia antigeenille DFS70. Positiivisten joukosta löytyi homogeenista, täplikästä, näiden muodostamaa sekakuviota sekä sentromeerista tumavasta-ainekuviota. 18 positiivisesta näytteestä kuudessa oli löydöksenä joko DNA-vasta-aineita tai liukoisia tumavasta-aineita, jotka taas viittaavat autoimmuunisairauteen.

Liitteessä 4. Tulosten laskenta, on esitetty taulukkomuodossa kaikki analysoidut näytteet sekä niiden tulokset DFS-70 määrittämisessä. Kuten oletettavissa oli, nukleolaarisen, sentromeerisen tai pistemäisen kuvion omaavat näytteet jäivät negatiivisiksi yhtä sentromeerista näytettä lukuun ottamatta. Positiiviset näytteet on esitetty alla olevassa taulukossa 11. Taulukossa on esitetty näytteen S-ANA tuloksen titteri ja kuvio, näytteen työstönumero sekä DFS-70 vastaus ilmoitettuna yksikköinä, jotka on värikoodattu tutkimisen helpottamiseksi näyttämään positiivisuuden tason. Taulukossa 12. on esitetty tarkemmat selitykset tuloksen värikoodille ja yksikkövälille, jolle tulos ja värikoodi ovat voimassa.

Taulukko 11. DFS70 positiiviset näytteet

Työstönumero	Titteri	Kuvio	DFS-70
N.1	5000	Täplikäs	29,5
13	320	Sekakuviot	21,3
18	1280	Homogeeninen	160
26	1280	Homogeeninen	85,5
29	320	Homogeeninen	41,2
32	1280	Homogeeninen	51
33	1280	Homogeeninen	152
40	1280	Homogeeninen	98,7
42	1280	Homogeeninen	179,4
48	5000	Täplikäs	159
52	1280	Täplikäs	127,3
70	320	Täplikäs	61,9
75	1280	Täplikäs	60,6
77	5000	Täplikäs	100,5
85	1280	Sentromeerinen	23,1
95	320	Sekakuviot	53,7
96	1280	Sekakuviot	88,6
101	1280	Homogeeninen	108

Taulukko 12. DFS-70 tulosten värikoodien selvitys

Tulosten värit

<20 negat.
20-39 Heikko posit.
40-80 posit.
>80 vahva posit.

18 positiivisesta näytteestä 8 oli homogeenista, 6 täplikästä 3 näiden muodostamaa sekakuviota sekä yksi sentromeerinen. Laimennoksia löytyi jokaista vahvuutta paitsi >5000. DFS-70 tulos oli kolmessa näytteessä heikko positiivinen, viidessä näytteessä positiivinen ja 10 näytteessä vahva positiivinen. Tarkistimme vielä näytteiden kuviot ja titterit. Osan näytteistä kuvio muuttui, sillä tuloksia uudelleen lukeneet lääkäri ja kemisti olivat perehtyneet DFS kuvion tunnistamiseen ja he yrittivät tunnistaa DFS-kuvion näytteistä. Osan näytteistä titteri muuttui ja yksi täplikkääksi vastattu näyte olikin uusintatutkimuksessa negatiivinen. Näyte oli kuitenkin positiivinen titterillä 320, jolloin se on raja-arvoinen ja vastaus saattaa olla tulosten lukijasta riippuen hiukan erilainen. Näytteet ovat olleet kahdesta kuukaudesta kahteen viikkoon pakastettuina ennen uusintatutkimusta ja se, että näytteitä on pakastettu ja sulatettu useaan kertaan analysoinnin aikana, voi vaikuttaa tuloksiin. Myös sarjojen välinen vaihtelu sekä tulkitsijasta johtuva vaihtelu vaikuttavat tuloksiin.

Näytteistä tehtiin vielä S -DNAAb ja S -ENAAb määritykset, joiden tarkoituksena oli selvittää, löytyykö näytteistä mitään tarkempaan autoimmuunisairauteen viittaavaa tulosta. 6 näytteestä löytyi. Taulukossa 13. on esitetty DFS70 positiiviset näytteet työstönumeroittain niin, että näkyvillä on myös S -DNAAb ja S -ENAAb tutkimustulokset sekä uusitut S -ANA tulokset.

Taulukko 13. DFS70 positiivisten näytteiden ENA ja DNA vasta-ainetulokset sekä uudet ANA tulokset

Titteri	Kuvio	Työstönumero	S-ENAAb tulos	ENA / ENA LA U/ml	S-DNAAb	S-DNAAb	Kuvio 31.5.	Titteri 31.5.
5000	Täplikäs	N.1	negative	-	<10 *	negative	Täplikäs	5000
320	Sekakuvio	13	negative	-	0,54 IU/ml	negative	Täplikäs	320
1280	Homogeeninen	18	negative	-	20 IU/ml	positive	Homogeeninen	1280
1280	Homogeeninen	26	negative	-	1,5 IU/ml	negative	DFS	1280
320	Homogeeninen	29	negative	-	0,8 IU/ml	negative	Homogeeninen tai DFS	320
1280	Homogeeninen	32	negative	-	0,7 IU/ml	negative	DFS	1280
1280	Homogeeninen	33	negative	-	3,8 IU/ml	negative	Homogeeninen	5000
1280	Homogeeninen	40	negative	-	1,7 IU/ml	negative	Tumamembraani	1280
1280	Homogeeninen	42	negative	-	1,6 IU/ml	negative	Homogeeninen tai DFS	1280
5000	Täplikäs	48	positive	SSA >240; SSB 271	1,1 IU/ml	negative	täplikäs	5000
1280	Täplikäs	52	negative	-	0,8 IU/ml	negative	Täplikäs	1280
320	Täplikäs	70	negative	-	0,7 IU/ml	negative	neg	<320
1280	Täplikäs	75	positive	SSA 60; SSB 257	0,7 IU/ml	negative	Täplikäs	1280
5000	Täplikäs	77	positive	SSA >240; SSB 146	2,2 IU/ml	negative	Täplikäs	1280
1280	Sentromeerinen	85	positive	SentB 41	1,8 IU/ml	negative	Sentromeerinen	1280
320	Sekakuvio	95	negative	-	0,9 IU/ml	negative	Homogeeninen tai DFS	320
1280	Sekakuvio	96	positive	SSA above	41 IU/ml	positive	täplikäs tai DFS	1280
1280	Homogeeninen	101	negative	-	0,8 IU/ml	negative	DFS	1280

\* Tutkittu immunofluoresenssimenetelmällä S –DNAnAb, vastauksen yksikkö on titteri

Näyteotanta on melko pieni ja positiivisia näytteitä pitäisi tutkia paljon enemmän. Lisäksi näytteistä olisi hyvä tutkia DNA ja ENA –vasta-aineet, jotta nähtäisiin, pitääkö alkuperäinen teoria paikkaansa, että DFS70 vasta-aineita esiintyy vain autoimmuunisairauksien suhteen terveillä ihmisillä. DFS-70 tutkimus jää tarpeettomaksi, mikäli tämä alkuperäinen oletus ei pidäkään paikkaansa. Tutkimustulokset lähetettiin myös reagenssipaketin valmistaneelle INOVA Diagnostics -yhtiölle.

## 6 Pohdinta

S-ANA tutkimus on kuitenkin epätarkka ja vaatii jatkotutkimuksia (Julkunen, Miettinen 2011). Tämän tutkimuksen materiaaleilla ei kuitenkaan ole selkeää näyttöä siitä, että DFS70 antigeenin määrittäminen toisi lisähelpotusta autoimmuunisairauksien diagnostiikkaan.

Mikäli tutkimus kaupallistetaan ja otetaan käyttöön laboratorioissa näytteen tutkimusjärjestys voisi olla sellainen, että S -ANA tutkimuksessa positiivisesta näytteestä tehtäisiin jatkotutkimuksena S -ENAAb sekä DFS-70 tutkimukset. Vaihtoehtoisesti S -ANA positiivinen, mutta S -ENAAb negatiivinen näyte voitaisiin tutkia DFS-70 määrityksellä, jolloin tulos helpottaa positiivisen kuvion syyn selvittämistä.

Vaikka potilaita on seurattu ja on todettu ettei DFS kuviota omaaville henkilöille kehity autoimmuunisairautta, ei kuitenkaan ole tutkittu, kuinka kauan potilaat pysyvät terveinä tai onko heillä tavallista väestöä suurempia riskejä sairastua autoimmuunisairauteen. (Mariz ym. 2011). Mittausta voitaisiin tehdä tumavasta-aine tutkimuksen suhteen negatiivisista näytteistä, sillä DFS70 antivasta-aineiden esiintyvyys voi viitata muihin sairauksiin (Mahler- Hanly - Fritztler 2011) Tällaisia tutkimuksia tarvittaisiin, jotta tiedetään, koetaanko DFS-kuvion tunnistaminen kliinisesti tärkeäksi. Tällöin myös erittäin kokeineet mikroskopioijat voivat harjoitella kuvion tunnistamista jo mikroskoopilla, vaikkakin se on erittäin hankalaa ja vaatii tuekseen DFS-70 määrityksen.

Loppujen lopuksi DFS-70 määrittäminen toimii moitteettomasti. Tulosten CV% olivat kohtuullisen alhaisia vaikka rinnakkaisissa määrityksissä olikin hieman heittoa. Ainoastaan reagenssipaketin negatiivisen kontrollin DFS-70 tuloksen CV% oli todella korkea. Kaikki määrittäytulokset olivat kuitenkin paljon alle heikon positiivisen tuloksen rajan joka on 20 yksikköä. Määrittäminen ei ollut laimennussarjojen suhteen lineaarinen, niinkuin oli luvattu. Reagenssipaketti on kuitenkin vasta kehitteillä, eikä valmistaja ollut ilmoittanut minikäänlaisia vaihteluvälejä kontrolleilleen. Ehkäpä he vielä kehittävät niiden koostumusta. Aika näyttää, onko tutkimuksella paikkaa Suomessa autoimmuunisairauksien diagnostiikassa.

## Lähteet

Mariz, Henrique A. – Sato, Emília I. – Barbosa, Silvia H. – Rodrigues, Silvia H. – Della-vance, Alessandra – E. C. Andrade, Luis 2011. Pattern on the Antinuclear Antibody-HEp-2 Test Is a Critical Parameter for Discriminating Antinuclear Antibody-Positive Healthy Individuals and Patients With Autoimmune Rheumatic Diseases, Arthritis & Rheumatism, Vol. 63 No. 1

Fritzler, Marvin J. 2011. The Antinuclear Antibody Test: Last or Lasting Gasp?. Arthritis & Rheumatism, Vol. 63 No.1.

Mahler, Michael - Hanly, John G. - Fritzler, Marvin J. 2011. Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases, Autoimmunity Reviews

Dorresteyn Stevens, Christine 2003. Clinical Immunology and Serology: A Laboratory perspective, Philadelphia: F.A. Davis Company.

INOVA Diagnostics Inc, 2012 QUANTA Lite tm DFS-70 ELISA, tuotepaketin ohje

Havana, Marika 2012. Tuma, vasta-aineet, S- ANA. Työohje

University of Birmingham 2013, HEp-2 image library, Verkkosivusto.  
<<http://www.birmingham.ac.uk/facilities/clinical-immunology-services/autoimmunity/hep-2-image-library/index.aspx>> Luettu 14.5.2013

Julkunen, Heikki – Miettinen, Aaro 2011. Autovasta-aineiden käytännön merkitys autoimmuunitauksissa. Suomen Lääkärilehti 42/2011. Verkkodokumentti.  
<[http://www.laakarilehti.fi/files/nostot/2011/nosto42\\_1.pdf](http://www.laakarilehti.fi/files/nostot/2011/nosto42_1.pdf)> Luettu 13.5.2013

VITA Laboratorio, 2012. Tuma, vasta-aineet. Verkkodokumentti.  
<[http://www.vita.fi/etsi.php?tutk\\_id=258](http://www.vita.fi/etsi.php?tutk_id=258)> Luettu 13.5.2013

Therapia Fennica. Systeeminen lupus erythematosus. Verkkodokumentti.  
<[http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Systeeminen\\_lupus\\_erythematosus\\_%28SLE%29](http://www.therapiafennica.fi/wiki/index.php?title=Systeeminen_lupus_erythematosus_%28SLE%29)> Luettu 13.5.2013

Halonen, Susanna 2005. Sjögrenin oireyhtymä. Oulun Yliopisto. Verkkodokumentti.  
<<http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/050224.htm>> Luettu 13.5.2013

UTULab, 2009. Tuma, vasta-aineet. Verkkodokumentti.  
<<http://www.med.utu.fi/tiedostot/ylab/pdf/TUMA,%20VASTA-AINEET.pdf>> Luettu 13.5.2013

UTULab, 2009. Ena – ja tuma vasta-aineiden analyysi. Verkkodokumentti.  
<<http://www.med.utu.fi/tiedostot/ylab/pdf/ENA-%20JA%20TUMAVASTA-AINEIDEN%20ANALYYSI.pdf>> Luettu 13.5.2013

Kurki, Pekka 1992. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim, 1992;108(16):1380. Tumavasta-aineiden ennustearvo reumataudeissa. Verkkodokumentti.  
 <[http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/haku?p\\_p\\_id=Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&\\_Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet\\_hakusana=tumavasta-ai- ne&\\_Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet\\_p\\_frompage=haku&\\_Article\\_WAR\\_DL6\\_ArticleArticle\\_viewType=viewArticle&\\_Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet\\_tunnus=duo20274](http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/haku?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_lifecycle=0&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_hakusana=tumavasta-ai- ne&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_p_frompage=haku&_Article_WAR_DL6_ArticleArticle_viewType=viewArticle&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_tunnus=duo20274)>  
 Luettu 13.5.2013

Goldsby, Richard A. – Kindt, Thomas J. – Osborne, Barbara A. 2000. Kuby Immunology. 4th edition. New York: W. H. Freeman and Company.

Roitt, Ivan – Brostoff, Jonathan – Male, David 2001. Immunology. 6th edition. Harcourt Publishers Limited.

Janeway, Charlie – Traves, Paul – Walport, Mark – Shlomchik, Mark 2005. Immunobiology, the immune system in health and disease. 6th edition. Garland Science Publishing.

Yhtyneet Medix laboratoriot, Laboratoriokäsikirja. S-DNAAb. Verkkodokumentti. Päivitetty 30.4.2013

<<http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/do.xsp?viewType=productview&redirect1=%2Fdo.xsp%3FobjectType%3Dproduct%26viewType%3Dlistview&objectType=product&directoryType=&productOID=753>> Luettu 14.5.2013



## Termistö

DFS-70: Tutkimus, joka suoritetaan ELISA-menetelmällä

DFS70: antigeeni, jolle terveellä ihmisellä voi olla autovasta-aineita. Näytteessä olevat vasta-aineet voidaan osoittaa DFS-70 menetelmällä

DFS: dense fine speckled eli hienojakoinen täplikäs kuvio, jota voi löytyä S-ANA tutkimuksen yhteydessä autoimmuunisairautta sairastamattomalta henkilöltä. Tämä kuvio on vaikea erottaa täplikästä kuvioista sekä homogeenisen ja täplikään kuvion muodostamasta sekakuviosta

S-ANA: (seerumista tehtävä tumavasta-ainetutkimus (Serum antinuclear antibody) tutkimus, jolla selvitetään tumavasta-aineita autoimmuunisairauseräilyissä. tehdään HEp-2 solulinjan soluilla. Mikäli tulos on positiivinen, voidaan fluoresenssimikroskoopin avulla nähdä hohtavia kuvioita.

**Näytteiden työstönumerot**

Titteri	Kuvio	Työstönumero
5000	Täplikäs	N.1
320	Sekakuvio	2
320	Sekakuvio	3
320	Sekakuvio	4
320	Sekakuvio	5
320	Sekakuvio	6
320	Sekakuvio	7
320	Sekakuvio	8
320	Sekakuvio	9
320	Sekakuvio	10
320	Sekakuvio	11
320	Sekakuvio	12
320	Sekakuvio	13
320	Sekakuvio	14
320	Sekakuvio	15
1280	Sekakuvio	16
320	Homogeeninen	17
1280	Homogeeninen	18
320	Homogeeninen	19
1280	Homogeeninen	20
1280	Homogeeninen	21
320	Homogeeninen	22
1280	Homogeeninen	23
320	Homogeeninen	24
320	Homogeeninen	25
1280	Homogeeninen	26
1280	Homogeeninen	27
320	Homogeeninen	28
320	Homogeeninen	29

320	Homogeeninen	30
320	Täplikäs	31
1280	Homogeeninen	32
1280	Homogeeninen	33
5000	Homogeeninen	34
5000	Homogeeninen	35
1280	Homogeeninen	36
1280	Homogeeninen	37
1280	Homogeeninen	38
5000	Homogeeninen	39
1280	Homogeeninen	40
1280	Homogeeninen	41
1280	Homogeeninen	42
320	Täplikäs	43
320	Täplikäs	44
320	Täplikäs	45
1280	Täplikäs	46
1280	Täplikäs	47
5000	Täplikäs	48
5000	Täplikäs	49
5000	Täplikäs	50
1280	Täplikäs	51
1280	Täplikäs	52
1280	Täplikäs	53
320	Täplikäs	54
320	Täplikäs	55
1280	Täplikäs	56
>5000	Täplikäs	57
1280	Täplikäs	58
5000	Täplikäs	59
1280	Täplikäs	60
5000	Täplikäs	61

1280	Täplikäs	62	
1280	Täplikäs	63	
5000	Täplikäs	64	
1280	Täplikäs	65	
1280	Täplikäs	66	
1280	Täplikäs	67	
320	Täplikäs	68	
320	Täplikäs	69	
320	Täplikäs	70	
320	Täplikäs	71	
320	Täplikäs	72	
320	Täplikäs	73	
320	Täplikäs	74	
1280	Täplikäs	75	
1280	Täplikäs	76	
5000	Täplikäs	77	
320	Täplikäs	78	
320	Täplikäs	79	
320	Täplikäs	80	
5000	Sentromeerinen	81	
5000	Nukleolaarinen	82	
320	H/N	83	POIS
5000	Sentromeerinen	84	
1280	Sentromeerinen	85	
320	Nukleolaarinen	86	
1280	Vastattu pelkkä titteri, putkessa pistemäinen	87	
320	Pistemäinen	88	
1280	Pistemäinen	89	POIS
5000	Pistemäinen	90	
PUUTTUI	PUUTTUI	91	POIS
PUUTTUI	PUUTTUI	92	POIS
320	Sekakuvio	93	

320	Sekakuvio	94
320	Sekakuvio	95
1280	Sekakuvio	96
1280	Homogeeninen	97
1280	Homogeeninen	98
1280	Homogeeninen	99
5000	Homogeeninen	100
1280	Homogeeninen	101
320	Sekakuvio	102
320	Sekakuvio	103
320	Sekakuvio	104
320	Sekakuvio	105

**Toteutuneet pipetointikaaviot kuoppalevyille**

21.5.2012 Ajo 1

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NEG	AB32	3	7	11	15							
B	NEG	AB32	3	7	11	15							
C	LOW POS	AB44	4	8	12	16							
D	LOW POS	AB44	4	8	12	16							
E	HIGH POS	PG24	5	9	13	17							
F	HIGH POS	PG24	5	9	13	17							
G	N.1	2	6	10	14	N.1							
H	N.1	2	6	10	14	N.1							

22.5.2012 Ajo 1

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NEG	18	22	26	30	34							
B	NEG	18	22	26	30	34							
C	LOW POS	19	23	27	31	35							
D	LOW POS	19	23	27	31	35							
E	HIGH POS	20	24	28	32	36							
F	HIGH POS	20	24	28	32	36							
G	N.1	21	25	29	33	37							
H	N.1	21	25	29	33	37							

## 22.5.2012 Ajo 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NEG	38	42	46	50	54						
B	NEG	38	42	46	50	54						
C	LOW POS	39	43	47	51	55						
D	LOW POS	39	43	47	51	55						
E	HIGH POS	40	44	48	52	56						
F	HIGH POS	40	44	48	52	56						
G	N.1	41	45	49	53	57						
H	N.1	41	45	49	53	57						

## 24.5.2012 Ajo 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NEG	59	63	67	71	75	1:02					
B	LOW POS	59	63	67	71	75	1:02					
C	LOW POS	60	64	68	72	76	1:04					
D	HIGH POS	60	64	68	72	76	1:04					
E	N.1	61	65	69	73	77	1:08					
F	N.1	61	65	69	73	77	1:08					
G	58	62	66	70	74	42	1:16					
H	58	62	66	70	74	42	1:16					

24.5.2012 Ajo 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NEG	79	86	95	99	103	32	33				
B	LOW POS	79	87	95	99	103	32	33				
C	LOW POS	80	88	96	100	104	32	1:02				
D	HIGH POS	80	90	96	100	104	32	1:02				
E	N.1	81	93	97	101	105	32	1:04				
F	N.1	82	93	97	101	105	32	1:04				
G	78	84	94	98	102	32	32	1:08				
H	78	85	94	98	102	32	32	1:08				



## Tulosten laskenta

### Kontrollien tulokset

	NEG				
	Abs 1	Abs 2	KA	SD	CV%
1.	0,054	0,059	0,0565	0,004809	8,7
2.	0,054	0,06	0,057		
3.	0,049	0,051	0,05		
4.	0,063	ei mitattu	0,063		
5.	0,053	ei mitattu	0,053		
		KA kaikista	0,055375		

	HIGH POS				
	Abs 1	Abs 2	KA	SD	CV%
1.	0,836	0,807	0,8215	0,036386	4,4
2.	0,824	0,806	0,815		
3.	0,883	0,843	0,863		
4.	0,864	ei mitattu	0,864		
5.	0,767	ei mitattu	0,767		
		KA kaikista	0,82875		

	LOW POS				
	Abs 1	Abs 2	KA	SD	CV%
1.	0,459	0,296	0,3775	0,08828	25,5
2.	0,396	0,287	0,3415		
3.	0,479	0,318	0,3985		
4.	0,243	0,33	0,2865		
5.	0,232	0,427	0,3295		
		KA kaikista	0,3467		

## Näyte N.1 Vastausten keskiarvo

Näyte N.1							
Kuoppalevyn paikka	Absorbanssi 1	Absorbanssi 2	Absorbanssien ka	LOW POS 1	LOW POS 2	LOW POS ka	Vastaus / l
1. 1G & 1H	0,374	0,25	0,312	0,296	0,459	0,3775	32,2
2. 6G & 6H	0,237	0,201	0,219	0,296	0,459	0,3775	22,6
3. 1G & 1H	0,317	0,232	0,2745	0,396	0,287	0,3415	31,3
4. 1G & 1H	0,374	0,253	0,3135	0,479	0,318	0,3985	30,6
5. 1E & 1F	0,26	0,251	0,2555	0,243	0,33	0,2865	34,7
6. 1E & 1F	0,223	0,216	0,2195	0,232	0,427	0,3295	25,9
Vastausten KA	29,5		Absorbanssien KA	0,266			
SD	4,5		Absorbanssien SD	0,058			
CV%	15,1		Absorbanssien CV%	21,9			

## Laimennossarjat

	Näyte	42				
Laimennos		abs1	abs2	ka	tulos	laskennallinen odotus
alkuperäinen		1,816	1,787	1,8015	244,6	
1:02		1,39	1,337	1,3635	185,1	122,30
1:04		1,144	0,981	1,0625	144,3	61,15
1:08		0,672	0,668	0,67	91,0	30,58
1:16		0,489	0,452	0,4705	63,9	15,29
	LOW POS	0,243	0,33	0,2865		

	33				
Laimennos	abs1	abs2	ka	tulos	laskennallinen odotus
alkuperäinen	1,199	1,22	1,2095	164,2	
1:02	0,862	0,833	0,8475	115,1	82,1
1:04	0,486	0,487	0,4865	66,1	57,5
1:08	0,3	0,29	0,295	40,1	33,0
1:16					
	LOW POS	0,232	0,427	0,3295	

## Näytteen 32 absorbanssit ajossa 2 24.5.2012

Kuoppalevyn paikka	Näyte 32 Absorbanssi	DFS- 70 tulos
6G	0,485	
6H	0,443	54,8
7A	0,482	
7B	0,436	54,2
7C	0,618	
7D	0,382	59,0
7E	0,408	
7F	0,396	47,5
7G	0,523	
7H	0,416	55,4
Absorbanssien keskiarvo	0,459	
Keskihajonta SD	0,071	
Absorbanssien CV%	15,5	
Ajon LOW POS KA	0,3295	
DFS- 70 KA	54,2	
DFS- 70 SD	4,2	
DFS- 70 CV%	7,8	

## Näytteet

Työstönumero	Absorbanssi 1	Absorbanssi 2	Absorbanssien ka	LOW POS 1	LOW POS 2	LOW POS ka	Vastaus / Units
2	0,087	0,084	0,0855	0,296	0,459	0,3775	8,8
3	0,085	0,087	0,086	0,296	0,459	0,3775	8,9
4	0,091	0,091	0,091	0,296	0,459	0,3775	9,4
5	0,092	0,089	0,0905	0,296	0,459	0,3775	9,3
6	0,107	0,112	0,1095	0,296	0,459	0,3775	11,3
7	0,094	0,097	0,0955	0,296	0,459	0,3775	9,8
8	0,087	0,095	0,091	0,296	0,459	0,3775	9,4
9	0,098	0,096	0,097	0,296	0,459	0,3775	10,0
10	0,082	0,086	0,084	0,296	0,459	0,3775	8,7
11	0,094	0,097	0,0955	0,296	0,459	0,3775	9,8
12	0,069	0,074	0,0715	0,296	0,459	0,3775	7,4
13	0,213	0,201	0,207	0,296	0,459	0,3775	21,3
14	0,093	0,099	0,096	0,296	0,459	0,3775	9,9
15	0,088	0,092	0,09	0,296	0,459	0,3775	9,3
16	0,065	0,074	0,0695	0,296	0,459	0,3775	7,2
17	0,086	0,087	0,0865	0,296	0,459	0,3775	8,9
AB32	0,538	0,503	0,5205	0,296	0,459	0,3775	53,6
AB44	1,314	1,045	1,1795	0,296	0,459	0,3775	121,5
PSG24	0,369	0,351	0,36	0,296	0,459	0,3775	37,1

Ajo vaihtuu 18	1,407	1,402	1,4045	0,396	0,287	0,3415	160,0
19	0,092	0,096	0,094	0,396	0,287	0,3415	10,7
20	0,128	0,124	0,126	0,396	0,287	0,3415	14,4
21	0,096	0,089	0,0925	0,396	0,287	0,3415	10,5
22	0,095	0,096	0,0955	0,396	0,287	0,3415	10,9
23	0,106	0,111	0,1085	0,396	0,287	0,3415	12,4
24	0,113	0,115	0,114	0,396	0,287	0,3415	13,0
25	0,103	0,104	0,1035	0,396	0,287	0,3415	11,8
26	0,778	0,724	0,751	0,396	0,287	0,3415	85,5
27	0,112	0,112	0,112	0,396	0,287	0,3415	12,8
28	0,095	0,098	0,0965	0,396	0,287	0,3415	11,0
29	0,413	0,31	0,3615	0,396	0,287	0,3415	41,2
30	0,125	0,136	0,1305	0,396	0,287	0,3415	14,9
31	0,083	0,087	0,085	0,396	0,287	0,3415	9,7
32	0,452	0,443	0,4475	0,396	0,287	0,3415	51,0
33	1,339	1,329	1,334	0,396	0,287	0,3415	152,0
34	0,083	0,085	0,084	0,396	0,287	0,3415	9,6
35	0,102	0,095	0,0985	0,396	0,287	0,3415	11,2
36	0,09	0,09	0,09	0,396	0,287	0,3415	10,3
37	0,088	0,089	0,0885	0,396	0,287	0,3415	10,1

Ajo vaihtuu 38	0,121	0,133	0,127	0,479	0,318	0,3985	12,4
39	0,083	0,086	0,0845	0,479	0,318	0,3985	8,2
40	1,019	1,003	1,011	0,479	0,318	0,3985	98,7
41	0,079	0,086	0,0825	0,479	0,318	0,3985	8,1
42	1,846	1,83	1,838	0,479	0,318	0,3985	179,4
43	0,074	0,083	0,0785	0,479	0,318	0,3985	7,7
44	0,091	0,09	0,0905	0,479	0,318	0,3985	8,8
45	0,095	0,095	0,095	0,479	0,318	0,3985	9,3
46	0,104	0,108	0,106	0,479	0,318	0,3985	10,3
47	0,076	0,081	0,0785	0,479	0,318	0,3985	7,7
48	1,656	1,602	1,629	0,479	0,318	0,3985	159,0
49	0,086	0,092	0,089	0,479	0,318	0,3985	8,7
50	0,085	0,087	0,086	0,479	0,318	0,3985	8,4
51	0,094	0,095	0,0945	0,479	0,318	0,3985	9,2
52	1,323	1,286	1,3045	0,479	0,318	0,3985	127,3
53	0,087	0,091	0,089	0,479	0,318	0,3985	8,7
54	0,094	0,097	0,0955	0,479	0,318	0,3985	9,3
55	0,078	0,084	0,081	0,479	0,318	0,3985	7,9
56	0,135	0,138	0,1365	0,479	0,318	0,3985	13,3
57	0,104	0,099	0,1015	0,479	0,318	0,3985	9,9

Liite 2  
1 (4)

Ajo vaihtuu 58	0,109	0,114	0,1115	0,243	0,33	0,2865	15,1
59	0,105	0,113	0,109	0,243	0,33	0,2865	14,8
60	0,109	0,11	0,1095	0,243	0,33	0,2865	14,9
61	0,105	0,104	0,1045	0,243	0,33	0,2865	14,2
62	0,109	0,109	0,109	0,243	0,33	0,2865	14,8
63	0,102	0,111	0,1065	0,243	0,33	0,2865	14,5
64	0,117	0,118	0,1175	0,243	0,33	0,2865	16,0
65	0,098	0,092	0,095	0,243	0,33	0,2865	12,9
66	0,083	0,082	0,0825	0,243	0,33	0,2865	11,2
67	0,113	0,114	0,1135	0,243	0,33	0,2865	15,4
68	0,08	0,087	0,0835	0,243	0,33	0,2865	11,3
69	0,117	0,116	0,1165	0,243	0,33	0,2865	15,8
70	0,475	0,437	0,456	0,243	0,33	0,2865	61,9
71	0,09	0,095	0,0925	0,243	0,33	0,2865	12,6
72	0,12	0,131	0,1255	0,243	0,33	0,2865	17,0
73	0,119	0,12	0,1195	0,243	0,33	0,2865	16,2
74	0,097	0,091	0,094	0,243	0,33	0,2865	12,8
75	0,446	0,446	0,446	0,243	0,33	0,2865	60,6
76	0,08	0,091	0,0855	0,243	0,33	0,2865	11,6
77	0,753	0,727	0,74	0,243	0,33	0,2865	100,5

Ajo vaihtuu 78	0,13	0,124	0,127	0,232	0,427	0,3295	15,0
79	0,095	0,098	0,0965	0,232	0,427	0,3295	11,4
80	0,079	0,082	0,0805	0,232	0,427	0,3295	9,5
81	0,094 vain yksi		0,094	0,232	0,427	0,3295	11,1
82	0,111 vain yksi		0,111	0,232	0,427	0,3295	13,1
84	0,11 vain yksi		0,11	0,232	0,427	0,3295	13,0
85	0,196 vain yksi		0,196	0,232	0,427	0,3295	23,1
86	0,079 vain yksi		0,079	0,232	0,427	0,3295	9,3
87	0,078 vain yksi		0,078	0,232	0,427	0,3295	9,2
88	0,106 vain yksi		0,106	0,232	0,427	0,3295	12,5
90	0,093 vain yksi		0,093	0,232	0,427	0,3295	11,0
93	0,08	0,083	0,0815	0,232	0,427	0,3295	9,6
94	0,077	0,082	0,0795	0,232	0,427	0,3295	9,4
95	0,484	0,425	0,4545	0,232	0,427	0,3295	53,7
96	0,751	0,75	0,7505	0,232	0,427	0,3295	88,6
97	0,095	0,096	0,0955	0,232	0,427	0,3295	11,3
98	0,095	0,094	0,0945	0,232	0,427	0,3295	11,2
99	0,085	0,086	0,0855	0,232	0,427	0,3295	10,1
100	0,132	0,157	0,1445	0,232	0,427	0,3295	17,1
101	0,918	0,911	0,9145	0,232	0,427	0,3295	108,0
102	0,11	0,11	0,11	0,232	0,427	0,3295	13,0
103	0,08	0,078	0,079	0,232	0,427	0,3295	9,3
104	0,088	0,088	0,088	0,232	0,427	0,3295	10,4
105	0,124	0,121	0,1225	0,232	0,427	0,3295	14,5

DFS70 –positiiviset näytteet

Titteri	Kuvin	Työstönumero	DFS-70	S-ENAAb tulos	ENA / ENA LA U/ml	S-DNAAb	Kuvin 31.5.	Titteri 31.5.
5000 Täplikkäs		N.1	29,5	negative	-	negative	Täplikkäs	5000
320 Sekakuvin		13	21,3	negative	-	negative	Täplikkäs	320
1280 Homogeeninen		18	160	negative	-	positive	Homogeeninen	1280
1280 Homogeeninen		26	85,5	negative	-	negative	DFS	1280
320 Homogeeninen		29	41,2	negative	-	negative	Homogeeninen tai DFS	320
1280 Homogeeninen		32	51	negative	-	negative	DFS	1280
1280 Homogeeninen		33	152	negative	-	negative	Homogeeninen	5000
1280 Homogeeninen		40	98,7	negative	-	negative	Tumamembraani	1280
1280 Homogeeninen		42	179,4	negative	-	negative	Homogeeninen tai DFS	1280
5000 Täplikkäs		48	159	positive	SSA >240; SSB 271	negative	täplikkäs	5000
1280 Täplikkäs		52	127,3	negative	-	negative	Täplikkäs	1280
320 Täplikkäs		70	61,9	negative	-	negative	neg	<320
1280 Täplikkäs		75	60,6	positive	SSA 60; SSB 257	negative	Täplikkäs	1280
5000 Täplikkäs		77	100,5	positive	SSA >240; SSB 146	negative	Täplikkäs	1280
1280 Sentromeerinen		85	23,1	positive	SentB 41	negative	Sentromeerinen	1280
320 Sekakuvin		95	53,7	negative	-	negative	Homogeeninen tai DFS	320
1280 Sekakuvin		96	88,6	positive	SSA above	positive	täplikkäs tai DFS	1280
1280 Homogeeninen		101	108	negative	-	negative	DFS	1280